

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ema Blagus

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ema Blagus

RAZGRADNJA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr.sc. Sandra Babić

Članovi ispitne komisije:

prof. dr. sc. Sandra Babić

dr. sc. Mirta Čizmić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, rujan 2016.

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Sandri Babić koja mi je svojim znanjem, savjetima i pomoći omogućila izradu ovog završnog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci i strpljenju, bez njih ovo sve ne bi bilo moguće.*

## SAŽETAK:

Farmaceutici su široka i raznolika grupa spojeva koji se koriste za liječenje, prevenciju i ublažavanje simptoma bolesti, kako kod ljudi, tako i kod životinja. Ubrajaju se u tako zvana “nova zagađivala” budući da otvaraju nova pitanja vezana uz njihovo ispuštanje u okoliš i prateću zakonsku regulativu. Ono što ih razlikuje od konvencionalnih zagađivala, poput pesticida, je njihovo disperzno podrijetlo iz kombiniranih i različitih radnji, ponašanja i aktivnosti mnoštva pojedinaca. Pojedinačni doprinosi su zanemarivi, ali njihovom kombinacijom nastaje mjerljiv utjecaj na okoliš.

Iako postoji više tisuća lijekova, a stotine ih se svakodnevno rutinski koristi u cijelom svijetu, za samo mali broj lijekova ispitan je i poznat utjecaj na okoliš. Nakon njihovog ispuštanja u okoliš, uglavnom preko postrojenja za obradu otpadnih voda, farmaceutici putuju kroz različite dijelove okoliša pri čemu može doći do njihove razgradnje kao posljedice različitih procesa. Razgradnja farmaceutika u okolišu često rezultira produktima različitih fizikalno-kemijskih svojstva u odnosu na početni spoj, a nerijetko su novonastali spojevi toksičniji od izvornih.

Cilj ovog rada je upoznati se s osnovnim svojstvima farmaceutika, njihovim izvorima i putevima dospjeća u okoliš te njihovom sudbinom u okolišu. Proučeni su i prikazani potencijalni putevi razgradnje i smanjenja koncentracija farmaceutika u okolišu usljed različitih procesa poput sorpcije, biorazgradnje, hidrolize i fotolize.

**Ključne riječi:** farmaceutici, “nova zagađivala”, razgradnja, izvori, putevi

## ABSTRACT:

Pharmaceuticals are a broad and diverse group of compounds produced for the purpose of treatment, prevention and alleviation of symptoms of the disease, both for human and animal usage. They are prototypes of so-called "new pollutants", since they open new questions related to their discharge into the environment. What divides them from conventional pollutants is their disperse origin from different actions, behaviors and activities of many individuals. Contribution of the individual is insignificant, but their combinations produce a measurable impact on the environment.

While there are thousands of drugs, hundreds routinely used every day worldwide, impact on the environment is known for only small part of them. After their release into the environment, mainly through the plants for waste water treatment, pharmaceuticals are exposed to transport and degradation. Degradation of pharmaceuticals in the environment often results in products of different physical and chemical properties compared to the parent compound, and often the newly established compounds are more toxic than the original one.

The aim of this work is to get acquainted with the basic characteristics of pharmaceuticals, their sources, pathways and their fate in the environment. Furthermore, potential elimination pathways through sorption, biodegradation, hydrolysis and photolysis are presented.

**Key words:** pharmaceuticals, "new pollutants", degradation, sources, pathways

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU.....	2
2.2. FARMACEUTICI: NOVA ZAGAĐIVALA 21. STOLJEĆA.....	3
2.2.1. Podjela novih zagađivala.....	3
2.2.2. Opsežnost i spektar novih zagađivala.....	4
3. IZVORI I PUTEVI FARMACEUTIKA U OKOLIŠU.....	5
3.1. FARMACEUTICI U TLU.....	8
3.1.1. Primjena farmaceutika u veterinarske svrhe.....	8
3.1.2. Stočarstvo i gospodarenje životinjskim otpadom.....	8
3.1.3. Utjecaj na mikrofloru i organizme.....	9
3.2. FARMACEUTICI U VODAMA U OKOLIŠU.....	10
3.2.1. Površinske vode.....	10
3.2.1.1. Morske površine.....	10
3.2.1.2. Slatke vode.....	11
3.2.2. Podzemne vode.....	11
3.2.3. Otpadne vode.....	12
3.2.4. Pitka voda.....	12
3.3. OTPORNOST U OKOLIŠU.....	13
3.3.1. Antibiotici.....	13
3.3.1.1. Klasifikacija antibiotika.....	14
3.3.2. Pojava otpornosti.....	14
3.3.3. Uloga bolnica.....	16
4. SUDBINA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU.....	16
4.1. PROCESI SMANJENJA KONCENTRACIJE FARMACEUTIKA U OKOLIŠU.....	16

4.2.SORPCIJA.....	17
4.3. BIORAZGRADNJA.....	18
4.4. HIDROLITIČKA RAZGRADNJA.....	19
4.5. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA.....	20
4.5.1. Direktna fotoliza.....	22
4.5.2. Indirektna fotoliza.....	23
5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU.....	25
5.1.UZORKOVANJE I ANALIZA REZULTATA.....	25
5.1.1. Priprema uzorka.....	25
5.1.2. Čuvanje uzorka.....	25
5.1.3. Koncentriranje i pročišćavanje.....	25
5.1.3.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	26
5.1.3.2. Ekstrakcija krutom fazom.....	26
5.2. KVANTITATIVNE ANALITIČKE METODE.....	27
5.2.1. Plinska kromatografija.....	27
5.2.2. Tekućinska kromatografija.....	28
5.2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	28
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. SKRAĆENICE I SIMBOLI.....	30
8. LITERATURA.....	31
9. ŽIVOTOPIS.....	33

## 1. UVOD

Farmaceutici su široka i raznolika grupa spojeva proizvedenih u svrhu liječenja, prevencije i ublažavanja simptoma bolesti, kako kod ljudi, tako i životinja. Uključuju preko tisuću jedinstvenih i raznolikih kemijskih spojeva koje posjeduju različita svojstva od bioaktivnosti, polarnosti do optičke aktivnosti. Ubrajaju se u tzv. “nova zagađivala” i njihov prijenos u okoliš je problem koji je počeo dobivati sve više pažnje tek u kasnim 1990-ima. Potječu iz prirodnih ili antropogenih izvora, a dizajn mnogih lijekova je kopiran ili nadahnut tvarima koje se uobičajeno nalaze u okolišu a posjeduju značajno farmakološko djelovanje.

Farmaceutici dospjevaju u okoliš nakon konzumacije bilo u medicinske ili veterinarske svrhe, te primjene u akvakulturi. Zbog nepotpunog uklanjanja u postojećim postrojenjima za obradu otpadnih voda, u okoliš dospjevaju putem otpadnih voda, ali i ispiranjem s poljoprivrednih površina, ukoliko se mulj iz postrojenja za obradu voda koristi kao gnojivo na poljoprivrednim površinama. Jednom kada dođu u okoliš dolazi do njihove razdiobe između sastavnica okoliša (voda, tlo, zrak), te biotičke i abiotičke razgradnje. Razgradnjom nastaju novi spojevi, odnosno razgradni produkti, drukčijih svojstva od izvorne komponente, često i veće toksičnosti. Kontinuirano ispuštanje farmaceutika i njihovih metabolita u okoliš potencijalno vodi do dugoročnog štetnog utjecaja na vodeni i kopneni ekosustav.

Posljednjih godina posebna pažnja posvećuje se potrebi za razumjevanjem toksikoloških problema vezanih uz višegeneracijsku izloženost ljudi i okoliša utjecaju malih doza kemijskih koktela. Njihova primjena otvara mnoga nova pitanja o zakonskoj regulativi glede utjecaja na okoliš. Njihova pojedinačna primjena nema poseban značaj, ali njihovom kombinacijom i spajanjem nastaju mjerljivi utjecaji na okoliš. Mogućnost kontrole i smanjenja njihove emisije u okoliš leži u opsežnim strategijama brige za okoliš, poput prevencije zagađenja. Ove strategije obuhvaćaju širok spektar mogućnosti od dizajna lijekova, njihove distribucije, uporabe, do odlaganja i obrade vode i tla.



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU

Farmaceutici i proizvodi za osobnu njegu (eng. *pharmaceuticals and personal care products*, PPCP) uključuju iznimno širok raspon tisuća kemijskih spojeva od kojih se većina koristi za direktnu uporabu ili u medicinske i veterinarske svrhe. Glavna razlika koja farmaceutike razdvaja od konvencionalnih zagađivala je raspršenost njihovih izvora.

Sama za sebe riječ farmaceutik odnosi se na kemikaliju pripremljenu ili izdanu u ljekarni koja liječi, sprječava ili ublažuje simptome bolesti ili fiziološke funkcije. Tehnički to ograničava opseg isključivo na lijekove na recept. Uža definicija farmaceutika isključuje lijekove “preko pulta” (eng. *over-the-counter*, OTC), sredstva za dijagnostiku (npr. kontrastna sredstva i radiološka sredstva), nutricionističke i dijetale dodatke, nedopuštene lijekove, kozmetiku ili lijekove koji nisu neophodni u medicinske svrhe i široku paletu proizvoda za osobnu njegu. PPCP-i ne uključuju samo izvorni oblik kemikalije nego i njene bioaktivne metabolite i razgradne produkte.

Najčešće prepisivani lijekovi, njihovo korištenje i cijena često variraju tijekom vremena, ovisno o promjenama u popularnosti među populacijom te otkriću novih aktivnih sastojaka (eng. *active pharmaceutical ingredient*, API) koji se uvode na tržište. API je kemijski sastojak koji ima farmakološku aktivnost ili neki pozitivan učinak u dijagnozi, liječenju ili tretiranju.

Koncentracija PPCP-a u okolišu može značajno varirati ne samo između država, već i između različitih lokacija unutar države. Mnoga pomoćna sredstva koja se koriste za proizvodnju lijekova također se koriste i u obradi hrane.

Iako je broj već postojećih lijekova iznimno velik, broj novo uvedenih lijekova je poprilično mali. Iako postoji više tisuća lijekova, a stotine se rutinski koristi u cijelom svijetu, samo ih je oko 100 identificirano u uzorcima iz okoliša. Ova činjenica proizlazi iz toga da nisu svi lijekovi korišteni u dovoljnim količinama da bi se mogli detektirati u okolišu, mnogi se metaboliziraju ili brzo razgrađuju smanjujući koncentraciju ishodnih spojeva. Mnogi farmaceutici se teško opažaju u malim koncentracijama u kompleksnom okolišu koristeći trenutno dostupne metode analize. Također, bitno je imati na umu da se prilikom praćenja

stanja okoliša opažaju ciljani lijekovi, dok ne ciljani promiču detekciji, baš kao i svaki drugi ne regulirani zagađivač.

Još uvijek ne postoji javna lista svih zabilježenih PPCP-a u okolišu. Glavni problem je da je informacije o uporabi lijekova (u bilo koje svrhe) iznimno teško i skupo dobiti .

Također, bitno je uočiti da se tek mali dio od ukupno uporabljenih lijekova odnosi na prepisane lijekove, dok veliki dio otpada na OTC lijekove. Čak niti broj prepisanih i prodanih lijekova nije sam za sebe dovoljan da bi procijenili ukupnu količinu koja se pojavljuje u okolišu. Potrebno je mnogo više podataka kako bi odredili utjecaj na okoliš. Također, treba imati na umu da ukupna količina PPCP-a u okolišu nije jedini faktor koji služi za procjenjivanje utjecaja na okoliš. Druga bitna karakteristika je biološki potencijal [1].

## **2.2. FARMACEUTICI: NOVA ZAGAĐIVALA 21. STOLJEĆA**

### **2.2.1. Podjela novih zagađivala**

Nova zagađivala su kemikalije iz prirodnih izvora ili sintetskog podrijetla koje su tek nedavno otkrivene i čiji se utjecaj na okoliš i zdravlje tek treba utvrditi. Glavni problem je ograničenost podataka o njihovim međusobnim odnosima i toksikološkim učincima na okolišne recipijente [2].

Glavi tipovi novih zagađivala su [2, 3]:

- 1.) farmaceutici i proizvodi za osobnu njegu,
- 2.) plastifikatori,
- 3.) usporivala gorenja,
- 4.) pesticidi,
- 5.) prirodna zagađivala i
- 6.) nanomaterijali.

Iako se njihov izvor u većini slučajeva ne može utvrditi, oni predstavljaju globalni problem jer su zabilježeni na gotovo svim lokacijama. O njihovom prijenosu i daljnjem

ponašanju u okolišu jako malo se zna, što se može pripisati ograničenim financijskim sredstvima i nedostatku analitičke tehnike za njihovo bolje razmatranje [2].

### 2.2.2. Opsežnost i spektar novih zagađivala

Analitička kemija igra ključnu ulogu u poboljšavanju i širenju broja kemikalija, pa tako među njima i novih zagađivala. S razvojem analitičke kemije i potrebene instrumentacije povećava se broj kemikalija koje se mogu pouzdano odrediti u okolišu. Smanjivanjem granica detekcije mijenja se koncept “čistoće”, “nule” i “sigurnosti” [4].

S razvojem novih postupaka i proizvoda široke potrošnje dolazi i potreba za novim kemikalijama, što u konačnici rezultira očitom potrebom provjere o mogućoj štetnosti istih. Zbog stalno rastućeg broja kemikalija raste i zagađenje [2]. Iako se broj poznatih organskih kemikalija čini velik, broj potencijalnih organskih kemikalija (onih koje je moguće sintetizirati, kao i onih koje već postoje, ali nisu identificirane) je neusporedivo veći i zamršeniji. Većina tako zvanog „spektra kemikalija“ još uvijek je nepoznata. Ako spektar kemikalija obuhvaća sve moguće strukturne konfiguracije pojedinog spoja do određene normirane veličine molekula, smatra se da postoji između  $10^{30}$  i  $10^{200}$  jedinstvenih struktura, ovisno o gornjoj granici veličine molekula.

Određene molekule (one asimetričnih struktura) postoje u višestrukim oblicima i njihove zrcalne slike se ne mogu preklapati. Takve molekule se nazivaju kiralnima, a njihovi parovi se nazivaju enantiomeri ili optički izomeri. Kiralnost igra glavnu ulogu u kemiji okoliša i toksikologiji. Kiralni spojevi mogu imati svojstva dviju ili više različitih kemikalija (ovisno o centrima simetrije) iako imaju isti sastav i dvodimenzijску strukturu.

Kiralni spojevi koji imaju jednake udjele optičkih izomera nazivaju se racemične smjese ili racemati. Izomeri akiralnih molekula koji posjeduju barem dva stereogena centra se nazivaju mezo izomeri. Jedan od najboljih primjera je HBCD (heksabromociklododekan, bromirano usporivalo gorenja) koji se sastoji od šest parova enantiomera, 4 mezo oblika te ukupno 16 stereoizomera, od kojih svi imaju isti sastav, ali različita svojstva. Najveći problem je da se svaki pojedini izomer ima drugačija svojstva. Npr. jedan izomer se može lako razgraditi, dok drugi zaostaje u okolišu, jedan može biti jako toksičan, dok drugi može imati potpuno drukčiji povoljan učinak ili biti potpuno inertan. Još jedan dobro znani primjer je talijdomid čiji jedan enantiomer ima efekt sedacije, dok drugi djeluje teratogeno.

Upravo zbog ovakvih slučajeva farmaceutska industrija i industrija pesticida pokušavaju dizajnirati optički čiste kemikalije, no i dalje ostaje pitanje kako regulirati stereokemijske spojeve, pogotovo u slučajevima kada je njihova detekcija gotovo nemoguća [2].

### **3. IZVORI I PUTEVI FARMACEUTIKA U OKOLIŠU**

Više faktora definira opseg i izvore farmaceutika u okolišu. Kao i većina kemikalija, farmaceutici mogu dospjeti u određene sastavne dijelove okoliša koji uključuju: vode (površinske i podzemne), tlo (sediment, tla, uključujući tla za poljoprivredu), zrak i živi svijet. Za sve izvore postoji i prostorna i vremenska dimenzija. Neki izvori imaju povremene emisije, dok drugi imaju kontinuirane emisije, ovisno o dnevnim i sezonskim potrebama. Na svom putu kroz okoliš farmaceutik može proći kroz razne promjene uslijed izloženosti raznim faktorima, a svaki korak na tom putu se može smatrati izvorom. Razlika između izvora, podrijetla i sudbine te što se točno smatra izvorom teško je definirati. Kada farmaceutik napušta tvornicu kreće u ciklus ponuda-potrošnja nakon čega se ispušta u okoliš. Općenito se porijeklom smatra mjesto na kojem nešto nastaje, dok je izvor točka iz koje je nešto dobiveno.

Izvori zagađenja su grubo podjeljeni u 2 vrste:

- 1.) točkasti i
- 2.) difuzni (netočkasti).

Točkasti izvori odnose se na zagađivala ispuštena sa specifične lokacije, a tipični primjeri su ispusti iz industrijskih aktivnosti i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Netočkasti izvori, bolje poznati kao difuzni, odnose se na nejasne izvore, tj. one koji se prostiru na većim površinama, a tipičan primjer je ispiranje tla u područjima u kojima se primjenjuju gnojiva. [16].

Novi izvori zagađenja ne uključuju samo novo uvedene kemikalije, već i nove načine njihove proizvodnje koji omogućuju nove načine njihova ulaska u okoliš [15].

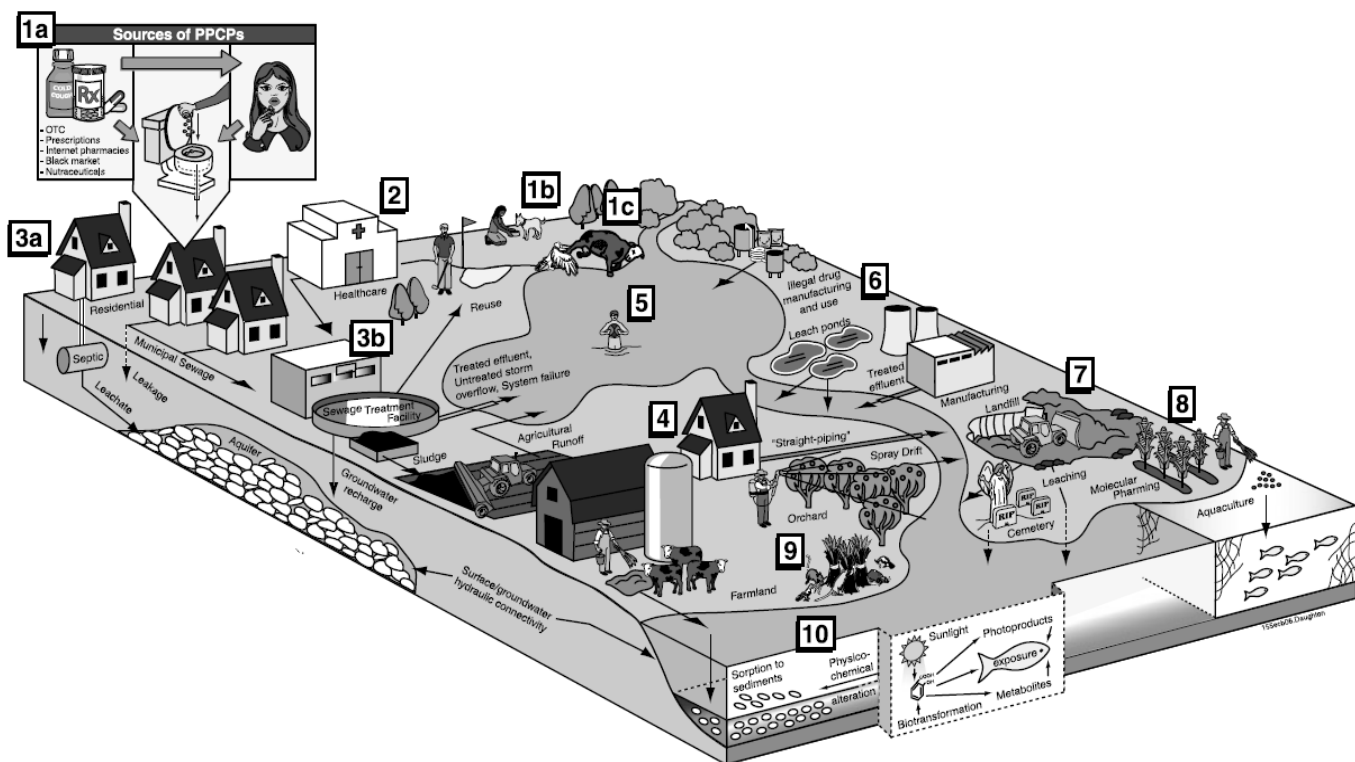
Primjeri:

- 1.) Komercijalno uvođenje novog lijeka
- 2.) Proizvodnja lijekova i cijepliva od genetski izmjenjenih biljaka
- 3.) Novo otkriveni nano materijali
- 4.) Pojava mikroreaktora koji omogućuju raspršenu proizvodnju opasnih kemikalija
- 5.) Ubrzani pristup potrošača kemikalijama, što uzrokuje nebrojno puno malih izvora

Kada bi rekli da je izvor mjesto gdje farmaceutik napušta ciklus potrošnje i ulazi u okoliš, daljnja razmatranja bi bila jednostavna, međutim nije tako. Antropogena zagađivala ulaz u zrak, površinske i podzemne vode, zemlju i živi svijet kao rezultat emisije iz tvornica, energetskih postrojenja, odlaganja otpada, namjernog izlaganja (pesticidi...), primjene kanalizacijskog mulja na tlo, slučajnih izljeva, kanalizacije, ilegalnog ispuštanja i potrošnje od strane potrošača.

Većina ovih izvora već odavno je prepoznata kao potencijalna opasnost za okoliš, dok je potrošačka aktivnost tek nedavno dobila status potencijalno velikog, dugoročnog i disperzanog izvora. Tijekom posljednjeg desetljeća, znanstvenici su otkrili velik, raznolik i ponekad neočekivan niz puteva koji služe za prenošenje farmaceutika od konzumenata (ljudi, životinje) do okoliša. Nakon ispuštanja u okoliš farmaceutici se mogu “pohraniti” i kasnije pojaviti iz sekundarnih izvora. Ova činjenica igra ključnu ulogu u planiranju protokola kojima se određuje hoće li se pri analizi uzimati mali uzorci koji dovoljno dobro predstavljaju cjelinu ili je potrebna vremensko-prostorna analiza. Na temelju rezultata analiza određuje se stupanj opterećenja okoliša te mjere zaštite i smanjenja rizika [1].

Izvor i putevi farmaceutika u okolišu prikazan su na **slici 1**.



**Slika 1.** Izvor i putevi farmaceutika u okolišu [1]

Legenda:

- 1.) Primjena u medicini (1a) i veterini (1b i 1c)
- 2.) Ispuštanje bolničkih voda u kanalizacijski sustav
- 3.) Otpadne vode iz kućanstva (ispuštanje u private septičke jame) (3a)  
Postrojenja za obradu otpadnih (ponovna uporaba obrađene vode, ispusti obrađenih  
otpadnih voda u prirodne recipijente) (3b)
- 4.) Aktivnosti u poljoprivredi
- 5.) Direktno ispuštanje u vode u okolišu (osobna higijena (pranje) ili rekreacija (kupanje,  
plivanje))
- 6.) Ispuštanje obrađenih voda industrijskih otpadnih voda
- 7.) Odlaganje na odlagalištima
- 8.) Ribogojilišta
- 9.) Ispuštanje kemikalija za suzbijanje štetočina
- 10.) Transport i sudbina farmaceutika u okolišu

### **3.1.FARMACEUTICI U TLU**

#### **3.1.1. Primjena farmaceutika u veterinarske svrhe**

Ljekoviti učinci farmaceutika u životinjskoj prehrani uočeni su još 1950-ih. Njihova je primjena u posljednjih 60 godina postala globalni trend na kojeg se svakim danom oslanja sve više industrija za uzgoj i proizvodnju hrane. Danas se koristi preko 150 farmaceutika od kojih je preko 90% prirodni produkt bakterija i gljivica, dok je manji dio sintetskih ili polusintetskih preinaka prirodnih spojeva. U njihovoj se proizvodnji koristi preko 400 aktivnih spojeva te su podaci o njihovim količinama i dalje nepoznanica za šire mase. Općenito nema regulative koja bi određivala maksimalne dopuštene koncentracije farmaceutika u okolišu, pa se njihovo štetno djelovanje određuje usporedbom „predviđenih koncentracija u okolišu“ i „koncentracija koje u okolišu ne izazivaju biološke učinke“.

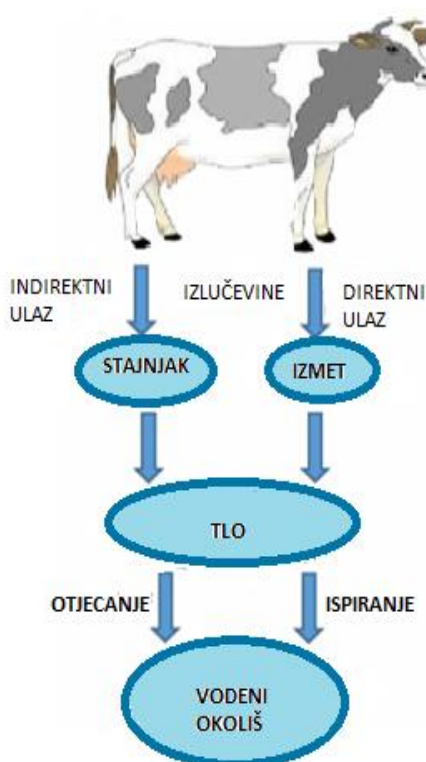
#### **3.1.2. Stočarstvo i gospodarenje životinjskim otpadom**

Procjenjuje se da je 2010. u svrhe stočarstva utrošeno oko 63151 tona farmaceutika te da ta brojka stalno raste. Neke od pretpostavka su da će se do 2030. taj broj povećati za alarmantnih 67%. Većina farmaceutika se ne uspjeva u potpunosti razgraditi u životinjskom probavom sustavu te putem izlučevina završava u okolišu. Još jedan od problema je praksa intenzivnog uzgoja stoke na malim područjima i kasnije nepravilno zbrinjavanje nastalog otpada. Zakoni ne propisuju nikakvu posebnu predobradu prije odlaganja životinjskog otpada koji se iz tog razloga učestalo koristi kao gnojivo. Na taj se način štedi na troškovima prikupljanja, transporta i pravilne obrade. Iako se ovaj način pokazao kao iznimno povoljan, zbog velike raznolikosti organskih spojeva i nutritivnih svojstva životinjskog otpada, to je ujedno i velika prijetnja zbog direktnog unosa farmaceutika u tlo.

Zbog sve češće poljoprivredne proizvodnje u kontekstu današnjeg globalnog scenarija, životinjski otpad spada u jedan od značajnijih izvora farmaceutika u okolišu. Farmaceutici lako ulaze u tlo iz kojeg njihovim prijenosom dospjevaju u vodeni ekosustav i nerijetko završavaju u biljnim sustavima. Ukoliko se farmaceutik u potpunosti ne razgradi, izlučuje se u okoliš u obliku izmeta, a preostali prerađeni dio izlazi u obliku drugih izlučevina. Procjenjuje se da se oko 75% farmaceutika izlučuje u svom primarnom obliku. Priroda

farmaceutika uvelike ovisi o vrsti životinje na koju se primjenjuje, o postupku primjene i brzini izlučivanja. Drugi (manje značajan) način ulaska farmaceutika u okoliš je preko ventilacijskog zraka iz industrija za uzgoj životinja, koje sadrže farmaceutike u obliku prašine. Ispušteni farmaceutici mogu se transportirati kao otopljena faza ili vezani na čestice tla u tlo ili podzemne vode [5].

Putevi ulaska u okoliš farmaceutika korištenih u veterinarske svrhe prikazani su na slici 2.



**Slika 2.** Putevi ulaska u okoliš farmaceutika korištenih u veterinarske svrhe [5]

### 3.1.3. Utjecaj na mikrofloru i organizme

Štetno djelovanje ovih ekotoksičnih spojeva također je uočeno i na mikroorganizmima i mikroflori. Male koncentracije farmaceutika mogu dovesti do promjena u mikrobiološkim populacijama što također može utjecati na čovjeka, npr. odumiranje mikroorganizama potrebnih biljkama za opskrbu hranjivim tvarima dovodi do neravnoteže u mikrobnim



populacijama zbog njihove selektivnosti čime se mijenja funkcija i sastav tla. Također, postoji mogućnost bioakumulacije i biomagnifikacije putem biljaka [5].

### **3.2. FARMACEUTICI U VODAMA U OKOLIŠU**

Pojava farmaceutika u vodi nije ograničena samo na površinske vode. Očekivano, veće koncentracije su određene u otpadnim vodama. Sve ovo ukazuje na veliku pokretljivost farmaceutika i veliku mogućnost njihova ulaska u pitke vode. Prisutstvo farmaceutika uočeno je u svim uzorcima vode, što se objašnjava niskom sklonosti za sorpciju na tlo.

Pojava farmaceutika u vodama u okolišu prvi put je zabilježena u Velikoj Britaniji još 1984. godine. Tek od 1990. veća pažnja počinje se pridavati novim spojevima koji se ne odeđuju u redovnim programima praćenja. Glavni uzrok tome je pojava estrogena u otpadnim vodama što je rezultiralo feminizacijom riba. S obzirom na izrazito velik broj spojeva, bilo bi preskupo analizirati sve te se zbog toga izabiru prioritetni. Prioritizacija uobičajeno uključuje procjenu dostupnih podataka o izvorima, volumenu, sudbini i razgradnji te o toksičnosti za vodene organizme. Postupak postavljanja prioriteta služi za otkrivanje koji farmakološki spojevi predstavljaju najveću opasnost i rizik za vodeni okoliš. Trenutno postoji puno nacionalnih i međunarodnih prioritetnih lista koje služe za praćenje prioritetnih spojeva. Iako su liste za praćenje dobar početak, treba ih se uzimati s određenom dozom pažnje jer su bazirane na akutnom, a nerijetko i letalnom efektu te zanemaruju one spojeve koje imaju učinke prilikom kronične izloženosti. Ukoliko se ovi podaci koriste u kombinaciji s testom za ekotoksičnost moguća je procjena rizika na vodeni okoliš.

#### **3.2.1. Površinske vode**

##### **3.2.1.1. Morske površine**

More je mjesta izravnog ispuštanja farmaceutika, stoga je moguće prikupiti veliki broj podataka o njihovim svojstvima. Moglo bi se očekivati da će razrijeđenje rezultirati niskim koncentracijama, međutim u nekoliko ispitivanja utvrđeno je da određeni farmaceutici preko estuarija dopijevaju u more. Sve novije studije usmjerene su na određivanje koncentracije farmaceutika u estuarijima blizu obalnog područja.

Ibuprofen je detektiran kao spoj s najvećom koncentracijom jer je lako dostupan, obzirom da se ubraja u OTC lijekove. U vodeni okoliš ulazi putem ljudske uporabe. Još jedan od faktora koji utječe na njegove visoke koncentracije u okolišu je njegova postojanost u okolišu.

Dva najzanimljivija farmaceutika detektirana u morima su klotrimazol i tamoksifen. Klotrimazol je sredstvo za suzbijanje gljivica i njegove određene koncentracije nisu toliko velike u usporedbi s drugim spojevima, ali dobiva posebnu pažnju zbog česte pojava na mjestima uljevanja otpadnih voda u more. Tamoksifen je poznati estrogen receptor i služi u liječenju raka dojke. Njegove koncentracije premašuju „koncentracija koje u okolišu ne izazivaju biološke učinke“ te postoji akutni rizik za morske organizme.

#### **3.2.1.2. Slatke vode**

Vrijeme zadržavanja je presudni parametar prilikom mjerenja koncentracije farmaceutika u rijekama i protočnim vodama. Prilikom utjecanja iz malih pritoka, povišene koncentracije se vrlo brzo smanje ispod granice detekcije usljed razrijeđenja, dok je pri većim protocima utjecaj razrijeđenja neznatan. Iz ove činjenice možemo zaključiti da hidrologija rijeke igra ključnu ulogu prilikom razrijeđenja za određenu lokaciju. Glavni zaključak mnogih istraživanja je da su otpadne vode glavni izvor farmaceutika u vodenim sustavima, ali se njihove koncentracije drastično smanjuju udaljavanjem od izvora zagađenja (nizvodno). Istraživanja u Njemačkoj pokazala su da vode koje nisu u blizini ispusta otpadnih voda imaju znatno niže koncentracije farmaceutika, bez obzira na efekt razrijeđenja. Ipak, najveći utjecaj povišenih koncentracija farmaceutika osjete vodene životinje, kao što su ribe.

#### **3.2.2. Podzemne vode**

Farmaceutici su detektirani u podzemnim vodama još sredinom 1990.-ih. Izvori zagađenja podzemnih voda su: industrija, otjecanje s poljoprivrednih zemljišta, odlagališta otpada te otpadne vode. Dva nezavisna istraživanja utvrdila su da su glavni izvori farmaceutika u podzemnim vodama ispiranje odlagališta otpada te ispiranje životinjskog otpada s poljoprivrednih površina i njegovo daljnje slijevanje u podzemne vode.

### 3.2.3. Otpadne vode

Otpadne vode su glavni izvor farmaceutika u drugim prijemnicima. Prisutstvo farmaceutika u vodenom okolišu ovisi o obradi otpadnih voda, vrsti farmaceutika, o farmakološko-kinetičkim te fizikalno-kemijskim svojstvima farmaceutika. Npr. aspirin se metabolizira u ugljikov dioksid pa ga je teško detektirati. Neke druge hidrofobne komponente će se sorbirati na mulj i tamo razgraditi na manje molekule koje se kasnije mogu detektirati. U sekundarnim izljevima mogu se detektirati ostaci lijekova kao što su antiflogistici, regulatori lipida i beta-blokatori. Najveći problem je razvoj otpornosti bakterija uslijed konstantne izloženosti antibioticima. Neki najaktivniji farmaceutici pokazali su slabu biološku razgradivost prilikom obrade otpadnih voda (ciprofloksacin, ofloksacin i metronidazol). Jedna od farmaceutskih skupina najčešće detektiranih u okolišu su ženki hormoni ( $17\beta$ -estradiol i  $17\alpha$ -etinilestradiol). Estrogen se iz organizma izlučuje uglavnom u konjugiranom obliku, a njegova dekonjugacija događa se tijekom biološke obrade otpadnih voda koja rezultira pojavom estrogena u ispustima otpadnih voda. Konjugirani i dekonjugirani oblici drugih farmaceutika također se mogu pojaviti kao rezultat obrade voda, što rezultira većim koncentracijama spojeva u ispustu nego u ulaznoj struji.

### 3.2.4. Pitka voda

Sama pojava farmaceutika ne bi bila toliko alarmantna obzirom da su koncentracije ispod terapijskih doza. Obrada otpadne vode je najbitniji korak jer zagađenja iz izvora ne smiju dospjeti u pitku vodu. Učinkovitost procesa obrade je od presudne važnosti za prisutstvo farmaceutika u pitkoj vodi [1].

### **3.3. OTPORNOST U OKOLIŠU**

#### **3.3.1. ANTIBIOTICI**

Pored široke raznolikosti farmaceutskih spojeva, antimikrobna sredstva su od posebnog značaja. Njihova pojava i sudbina u okolišu posebno zabrinjavaju znanstvenike i javnost zbog mogućeg širenja i razvoja bakterijske otpornosti putem trajne izloženosti. Ovakvi učinci mogu se pojaviti kao posljedica ispuštanja otpadnih voda iz farmaceutskih pogona i bolnica te su već zabilježeni slučajevi pojave otpornih bakterija u rijekama.

Antimikrobna sredstva, također znana i kao antibakterijska ili antiinfekcijska sredstva uključuju sintetske i prirodne spojeve. U daljnjem tekstu antimikrobno se odnosi na antibiotike, jer su ostala antimikrobna sredstva poput antifungicida i antiparazitskih sredstva izvan opsega trenutnih istraživanja.

Pojedine antibiotici koriste se pri uzgoju stoke i peradi, a oblikovani su tako da povećaju stopu rasta poboljšanjem učinkovitosti hrane. U Europi se 2/3 farmaceutika koristi za liječenje ljudi, a 1/3 u veterinarske svrhe. U medicini antibiotici predstavljaju 3. najveću grupu među farmaceuticima i spadaju u 6% ukupno prepisanih lijekova. U veterini čak preko 70% svih prepisanih farmaceutika su antibiotici.

Potrošnja velikih količina antibiotika dovela je do njihove velike rasprostranjenosti u okolišu. Uglavnom ulaze u okoliš preko vodotokova kroz ispuste otpadnih voda. Drugi veliki izvori su: farme za uzgoj riba, korištenje gnojiva za tretman bilja (mogu se pohranjivati u lagunama ili odmah koristiti u poljoprivredne svrhe za povećanje plodnosti tla), bolnički i industrijski efluensi i izljevi iz farmaceutskih pogona.

Česta detekcija ostataka antibiotika u pogonima za obradu otpadnih voda ukazuje na njihovo nepotpuno uklanjanje prilikom obrade. Postotak uklanjanja značajno ovisi o spoju i uvjetima provedbe procesa obrade. Sorpcija i razgradnja su glavni procesi koji se odvijaju tijekom obrade otpadnih voda u svrhu uklanjanja organskih mikrozagađivala. Samo praćenje nestanka nekog spoja nije dokaz da je on uklonjen, već je moguće da postoji u drugom obliku. Identificiranje metaboličkih produkata je teško budući da postoji veliki broj metabolita i produkata razgradnje, kao i zbog visoke cijene takvih analiza ili nedostatka propisa. Poznato

je da se antimikrobna sredstva metaboliziraju u organizmu nakon konzumacije u različitim omjerima i da samo njihov mali dio izlazi nepromjenjen.

Općenito metabolizam je proces koji teče u dva dijela. U 1. koraku dolazi do reakcija oksidacije, redukcije ili hidrolize. U 2. koraku odgovarajući lijek ili njegov primarni metabolit kovalentno se veže za polarnu molekulu prisutnu u tijelu, kao što su šećeri, sulfati i kiseline. Kao posljedica, nastali metaboliti su polarniji od ishodnog spoja i lakše se izlučuju iz organizma. U nekim slučajevima metaboliti pojedinog lijeka mogu biti aktivniji od ishodnog lijeka. Također postoji mogućnost da se pod određenim uvjetima u okolišu ili tijekom postupka obrade otpadnih voda određeni izlučeni metaboliti ponovo transformiraju u primarni oblik [1].

### **3.3.1.1. Klasifikacija antibiotika**

Postoje različite vrste klasifikacije antibiotika. Uobičajene su podjele na temelju:

- 1.) Bakterijskog spektra - uski, široki
- 2.) Načina primjene - oralno, injektivno
- 3.) Aktivnosti - bakteriostatske i baktericidne
- 4.) Kemijske strukture - aminoglikozidi, beta-laktami, glikopeptidi, makrolidi, oksazolidinoni, kinoloni, sulfonamidi, tetraciklini

S analitičke strane najznačajnija i najkorisnija podjela je s obzirom na kemijsku strukturu [1].

### **3.3.2. Pojava otpornosti**

Pojava otpornosti je vrlo složen i još ne razjašnjen proces na koji utječu interakcije između bakterijskih populacija i antibiotika. Otpornost je evolucijski zadržan prirodan proces prilagodbe i preživljavanja i kao takav nije iznenađujuć niti nov.

Otpornost mikroorganizma može biti nasljeđena putem stanične diobe ili razvijena prilikom kontakta ili tretmana mikroorganizma s antibiotikom. Otpornost se može prenositi između mikroorganizama putem razmjene genetskog materijala konjugacijom. Glavna prednost mikroorganizama je što se brzo umnažaju te mogu udvostručiti svoj broj u samo 20-30 minuta što im omogućava brzu prilagodbu i opstanak u nepogodnim vanjskim uvjetima.

Još jedan faktor koji utječe na njihovu prilagodljivost je što se individualna stanica ne oslanja samo na svoj genetski materijal. Većina ima pristup velikom broju putujućih gena koji se dijele od jedne do druge stanice te naposljetku kroz cijelu populaciju.

Otpornost na antibiotike uglavnom se kvantificira kao minimalna potrebna koncentracija da se postigne određeni utjecaj na populaciju stanica. Iz medicinskog iskustva naučeno je da je za prijenos gena za otpornost zaslužna duža vremenska izloženost antibioticima i to u takvim koncentracijama koje ne inhibiraju ili ubijaju sve bakterije osjetljive na antibiotik. Pojava otpornosti se akumulira i ubrzava, posebice u medicinskim okruženjima, dok alati za suzbijanje padaju u snazi i broju.

Prijenos otpornih bakterija može se odvijati preko vode ili hrane; npr. ako se biljka zaljeva s površinskom vodom ili kanalizacijskim muljem za poboljšanje plodnosti tla ili preko mesa.

Bakterije otporne na antibiotike nađene su u vodenom okolišu i tlu. Porijeklo otpornosti se i dalje raspravlja, ali je pretpostavka da je proizašla iz postrojenja za obradu otpadnih voda. Bakterije tvore biofilmove vrlo visoke gustoće u aerobnim i anaerobnim uvjetima kako bi povećale svoju otpornost, ali ujedno oni ne sprječavaju međusobni prijenos genetskog materijala. Preduvjet za prijenos genetskog materijala je da je bakterija sposobna opstati u nepogodnim uvjetima ili da je genetski materijal dovoljno stabilan da se prenese u novi okoliš, npr. iz ljudskog tijela u površinske vode koje su znatno hladnije i siromašnije nutrijentima.

Glavna pitanja koja se nameću su: Da li je unos antibiotika u okoliš izvor pobude otpornosti bakterija u okolišu? Da li će dugotrajno izlaganje antibioticima promovirati otpornost ili će opstati samo otporne bakterije? Da li prijenos otpornosti s bakterija proizlaziti iz nepravilne primjene antibiotika?

Prijenos i nove kombinacije gena za otpornost najprije će se pojaviti u područjima visoke gustoće bakterija, npr. biofilmovima. Neki rezultati ukazuju da prijenos otpornosti i selekcija otpornih bakterija nije preferiran kod visokih koncentracija kao u bolničkim otpadnim vodama. Bitan izvor otpornih bakterija nađenih u bolničkim i komunalnim otpadnim vodama su bakterije koje su već postale otporne kroz primjenu antibiotika u medicinske svrhe.

### 3.3.3. Uloga bolnica

Smatra se da su bolnice najčešći izvor antibiotika i otpornih bakterija. Ako uzmemo u obzir da bolničke otpadne vode doprinose s manje od 1% ukupnih komunalnih otpadnih voda, moguće je da bolnice nisu glavni izvor otpornih bakterija. Zbog kućne primjene antibiotika pretpostavlja se da je zajednica generalno kriva [6].

## 4. SUDBINA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

Farmaceutici se bitno razlikuju po molekularnoj strukturi, molarnoj masi i ostalim fizikalno-kemijskim svojstvima, unatoč tome što pripadaju istoj skupini. Različite funkcionalne grupe molekula utječu na njihovu aktivnost. Glavna svojstva farmaceutika su fotostabilnost, sorpcija na krute materijale, biorazgradivost i topljivost u vodi.

Svojstva poput koeficijenta raspodjele oktanol/voda ( $K_{ow}$ ), koeficijenta sorpcije ( $K_d$ ), konstante disocijacije ( $pK_a$ ), tlaka pare ili konstante Henryevog zakona ( $K_h$ ) služe za određivanje gdje će se komponenta najvjerojatnije koncentrirati; u zraku, vodi ili tlu. Spojevi s velikim vrijednostima  $\log K_{ow}$  pokazuju afinitet sorpcije na čestice tla i sedimenta što rezultira smanjenjem koncentracije u vodenoj fazi [8].

### 4.1. PROCESI SMANJENJA KONCENTRACIJE FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

Farmaceutici prisutni u okolišu podležu različitim procesima koji vode smanjenju njihove koncentracije što vodi nemogućnost detekcije ishodne (roditeljske) komponente u promatranoj fazi ili djelu okoliša, npr. vodenoj fazi [9].

Procese koji vode smanjenju koncentracije farmaceutika u okolišu djelimo na biotičke i abiotičke. Pod biotičke procese ubraja se biorazgradnja pomoću bakterija i gljivica. Abiotička razgradnja podrazumjeva sorpciju, hidrolizu, fotolizu, oksidaciju i redukciju. Sudbina farmaceutika u okolišu, odnosno njegova sklonost razgradnji, osim o strukturi polaznog spoja ovisi i o uvjetima kao što su temperature, lokacija, itd [8].

## 4.2.SORPCIJA

Važan put smanjenja koncentracije farmaceutika u okolišu je njihova sorpcija. Sorpcija farmaceutika na čestice tla ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima farmaceutika, klimatskim uvjetima, vrsti tla, sadržaju organske tvari te drugim okolišnim čimbenicima. Koeficijenti sorpcije za razne vrste farmaceutika te komponente tla mogu se pronaći u mnogobrojnim studijama [9].

Ovisno o vrijednosti koeficijenata, različiti antibiotici imaju različite afinitete za sorpciju za čvrstu fazu, čime se određuje njihova pokretljivost u okolišu. Pokretljivost kroz tlo ukazuje na različito kretanje antibiotika kroz tlo do podzemnih voda te na njihovo rasprostranjivanje prilikom površinskih otjecanja. Prisustvo otopljene organske tvari smanjuje apsorpciju antibiotika. Također, pH, udio organske tvari i različiti minerali tla uvelike utječu na sorpciju. Sorpcija antibiotika na sterilni stajski gnoj, kompost i huminske kiseline ovisi o vremena izloženosti i pH-vrijednosti. pH-vrijednost medija određuje ionizaciju brojnih spojeva čime utječe na njihovu sorpciju. Promatranjem sorpcije penicilina G uočena je maksimalna sorpcija pri pH-vrijednostima 6.0 i temperaturi od 35 °C [8].

Neki farmaceutici (npr. tetraciklin) imaju tendenciju vezivanja na čestice tla ili se javljaju u obliku kompleksa. Npr. humusne tvari mogu mijenjati svojstva površine i time utjecati na mjesta dostupna za sorpciju. Sorpcija antibiotika određena je količinom i prirodom suspendiranih čestica u vodenoj fazi, prisutstvom organske tvari u tlu, mineralima tla te koeficijentom razdiobe. Vezivanje na čestice ili formiranje kompleksa uzrokuje smanjenje koncentracije kao i gubitak farmaceutske aktivnosti. Ovo otkriće nije zanimljivo samo s gledišta razgradnje, već naglašava problematičnost primjene takvih potencijalno neaktivnih farmaceutika u akvakulturi.

$K_{ow}$  je mjera hidrofobnosti neke molekule. Koeficijent sorpcije izražava se preko  $\log K_{ow}$ . Farmaceutici uglavnom imaju niske vrijednosti, ispod 5, što ukazuje na njihova relativno hidrofobna svojstva. Očekivano je da će se spojevi koji imaju vrijednosti  $\log K_{ow}$  iznad 3 dobro sorbirati na mulj ili sediment [7]. Unatoč saznanjima, javlja se problem nedostatka podatka na ovom području [9]. Iznos koeficijenata sorpcije na tlo za istražene farmaceutike varira od 0,2 do 6000 mg/L [1].



Sorpcija spojeva uvelike ovisi o kemijskoj strukturi spojeva. Neki farmaceutici sadrže planarne aromatske strukture koje su povoljne za interakcije s npr. slojevima minerala gline. Farmaceutici se mogu taložiti u obliku biofilma (kanalizacijske cijevi), flokulama mulja ili na suspendiranim česticama u rijekama i jezerima. Ponašanje i učinci farmaceutika u takvih biokrutinama visoke gustoće i posebnim uvjetima još nije dovoljno istraženo. Također, nije poznato koliko snažno se antibiotici mogu vezati na mulj, čestice ili biokrutine poput kanalizacijskog mulja i sedimenata te u kojim okolnostima su oni dostupni i aktivni za sorpciju. Dakle sorpcija spojeva ne ovisi samo o  $\log K_{ow}$  već i o pH, redoks potencijalu, stereo kemijskoj strukturi te prirodi sorbensa i sorbirane molekule [7].

#### **4.3. BIORAZGRADNJA**

Biorazgradnja farmaceutika važan je aspekt procjene njihove sudbine u okolišu i rizika za okoliš. Biološka razgradnja može rezultirati djelomičnom razgradnjom ili potpunom mineralizacijom spojeva u vodenom okolišu.

Mikroorganizmi koriste organske spojeve kao izvor energije za njihov rast i razvoj. Razgradnja nekih spojeva je bez energetske dobiti, dok drugi pružaju potrebnu energiju. Neki se spojevi ne razgrade potpuno, tj. razgradnja završava prije završetka mineralizacije čime nastaju intermedijari koji mogu biti stabilniji od samih izvornih spojeva. Također se često razlikuju po toksičnosti i potencijalu akumulacije. Bakterije i gljive su dvije grupe koje imaju najveću sposobnost razgradnje organskih spojeva. Gljivice igraju jako važnu ulogu u tlu, ali u vodenim sustavima nisu značajne. Smatra se da su bakterije iz postrojenja za obradu, podzemnih, površinskih i morski voda odgovorne za većinu procesa biorazgradnje. Biorazgradnja ovisi o temperaturi, a niske vrijednosti temperature smanjuju brzinu razgradnje. Ova činjenica je alarmirajuća, pogotovo za zemlje s hladnom klimom jer razgradnja traje duže te može doći do zamrzavanja tla i lakšeg prodiranja u okoliš prilikom otjecanja otopljenog snijega.

Laboratorijska ispitivanja biorazgradnje daju nam rezultate u razumnom roku i pomažu smanjenju troškova. Bakterije koje su prethodno aklimatizirane imaju značajan utjecaj na valjanost rezultata, tj. dobivaju se bolji rezultati. Budući da su antibiotici dizajnirani

s namjenom suzbijanja bakterija, ta točka ima poseban značaj na ispitivanje biorazgradivosti antibiotika. Motrenje toksičnosti na bakterije prije samog testa biorazgradnje također je bitan korak u svrhu izbjegavanja pogrešnih rezultata. Glavno pitanje je koji test i koje parametre treba koristiti prilikom procjene, a to ponajviše ovisi o raznolikosti unutar bakterijske populacije i o aktivnosti ispitivanog spoja. Promjene se događaju promjenom vremena i ovisе o svakoj vrsti bakterija zasebno. Provođenje testa na samo jednoj bakterijskoj vrsti uobičajno rezultira krivuljom doza-činak. Za svaki test se koriste drugi parametri kojima se prati djelovanje na različite bakterijske skupine. Glavna pretpostavka je da će razgradnja u površinskim vodama biti sporija nego u kanalizacijskom sustavu zbog niže bakterijske gustoće i manje raznolikosti.

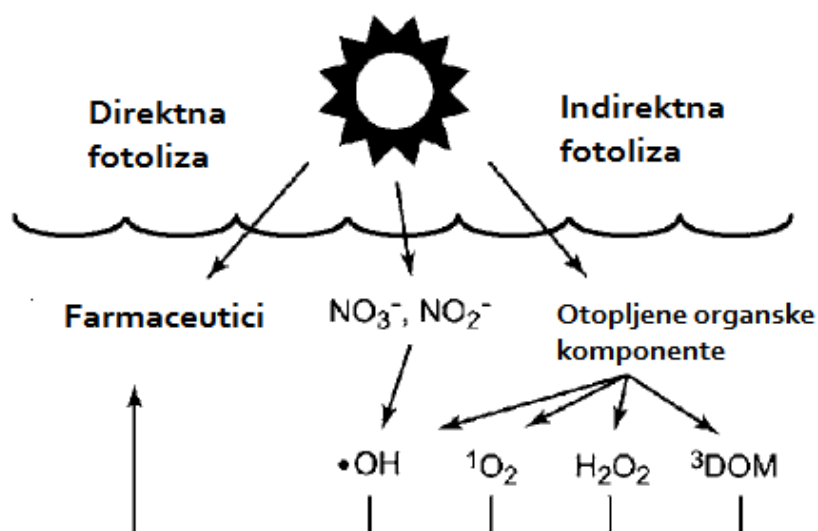
U jednom od istraživanja dokazano je da više od dvadeset spojeva koji predstavljaju najvažnije grupe antibiotika nije biorazgradivo [9]. U drugom testu provedenom na 16 antibiotika samo se 1 (penicilin G) potpuno mineralizirao. Test je simulirao kanalizacijske uvjete te je do 25% razgradnje penicilina G došlo tek nakon 21 dana, dok se ceftriakson i trimetoprim nisu razgradili. Također, utvrđeno je da je biorazgradivost linkosamina u SBR reaktoru bila manja za otpadne vode nego sa sintetičkim otpadnim vodama. Neki od antibiotika koji se pojavljuju u tlu i sedimentu pokazali su se kao vrlo otporni na laboratorijska i terenska istraživanja. Tvari koje se redovito primjenjuju pri uzgoju riba su pokazale dugi vijek polu raspada u tlu i sedimentu [8].

#### **4.4. HIDROLITIČKA RAZGRADNJA**

Još jedan abiotički način razgradnje organske tvari u okolišu je hidroliza. Nestabilnost u vodi je najbolje prikazivati preko primjera tetraciklina, tako se npr. oksitetraciklinu stupanj hidrolize povećava povećanjem pH i temperature. Međutim sulfonamidi i kinolini su otporni na hidrolizu. Laboratorijskim testiranjem kanalizacijskog mulja utvrđeno je da se  $\beta$ -laktami brzo hidroliziraju. To dovodi do deaktivacije antibiotske aktivnosti. To znači da se većina najčešće primjenjivanih penicilina neće moći detektirati u okolišu u očekivanom rasponu koncentracija [8].

## 4.5. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA

Pojam fotolitičke razgradnje općenito obuhvaća razgradnju neke molekule njenim izlaganjem svjetlosti. U vodama u okolišu fotoliza može biti direktna i indirektna (**slika 3**). Pri direktnoj fotolizi ciljani farmaceutski spoj apsorbira Sunčevo zračenje što dovodi do razgradnje molekule, dok kod indirektna fotolize spoj ne mora ili ne može apsorbirati Sunčevu svjetlost.



**Slika 3.** Direktna i indirektna fotoliza u vodenim sustavima [1]

Kvantno iskorištenje je svaka transformacija kemikalije prilikom apsorpcije fotona. Kada kemikalija apsorbira foton ona prelazi u pobuđeno stanje prilikom kojeg može doći do raznih fizičko-kemijskih promjena. Sudbina ovisi o prirodi kemikalije i njenom okruženju, a krajnji rezultat je deaktivacija i povratak u početno stanje. Proces koji kao što su gubitak energije, prijenos energije na druge molekule ili emisija fotona mogu dovesti do regeneracije roditeljskog spoja. Vrijednost kvantnog iskorištenja varira od 0 do 1, ali vrijednosti između 0,0001 i 0,1 odgovaraju spojevima koji su fotolitički razgradivi u nekom razumnom vremenu (vrijeme polu raspada između minute i dana).

Konstanta brzine reakcije 1. reda za razgradnju kemikalije dana je formulom:

$$k_{\text{obs}} = 2.303 \int_{\lambda} (\Phi_{\lambda} \varepsilon_{\lambda} I_{\lambda}) d\lambda \quad (1)$$

Gdje je  $\kappa_{obs}$  (konstanta brzine za izravnu fotolizu) jednaka umnošku kvantnog iskorištenja ( $\phi_\lambda$ ), molare apsorptivnosti spoja ( $\epsilon_\lambda$ ), solarnog zračenja ( $I_\lambda$ ) i integrala valne duljine ( $\lambda$ ). Brzina fotolize je funkcija apsorpcije svjetlosti i kvantnog iskorištenja. Spoj s apsorpcijskim spektrom koji se preklapa sa spektrom Sunčeva zračenja i malim kvantnim iskorištenjem postojaniji je na fotolitičku razgradnju od spoja čiji spektar se slabo preklapa sa spektrom Sunčeva zračenja ali ima veliko kvantno iskorištenje. Npr. apsorpcijski spektar ranitidin ima slabije preklapanje sa spektrom Sunčevog zračenja u odnosu na nitrofurantoin, ali veće kvantno iskorištenje te se zbog toga razgrađuju sličnim brzinama.

Svi spojevi, apsorbirali oni fotone ili ne, potencijalno podliježu neizravnoj fotolizi. Pri indirektnoj fotolizi, spoj prisutan u uzorku apsorbira svjetlost i potom reagira izravno s farmaceutikom ili nastaje reaktivni intermedijer koji reagira s farmaceutikom. Glavna vrsta koja apsorbira Sunčevo zračenje je otopljenom organska tvar prisutna u prirodnim vodama. Pobuđenje uzrokovano otopljenom organskom tvari dovodi do stvaranja raznih fotokemijski reaktivnih intermedijara (eng. *Photochemically produced reactive intermediate* PPRI), uključujući hidroksil radikale, singletni kisik, peroksi radikale i superoksid. Osim otopljene organske tvari, u vodama postoji još vrsta koje mogu uzrokovati nastajanje PPRI-a, poput nitrata i nitrita koji vode stvaranju hidroksil radikala pod djelovanjem Sunčevog zračenja.

Brzina reakcije s reaktivnim česticama je diktirana njihovim stabilnim stanjem i njihovom konstantom brzine kemijske reakcije. Koncentracija hidroksil radikala u stabilnom stanju je između  $10^{-18}$  do  $10^{-15}$  mol/L u osunčanim vodama, što vodi do brzine razgradnje od približno  $10^{-5}$ – $10^{-8}$ s<sup>-1</sup>, čak i za najnereaktivnija organska zagađivala.

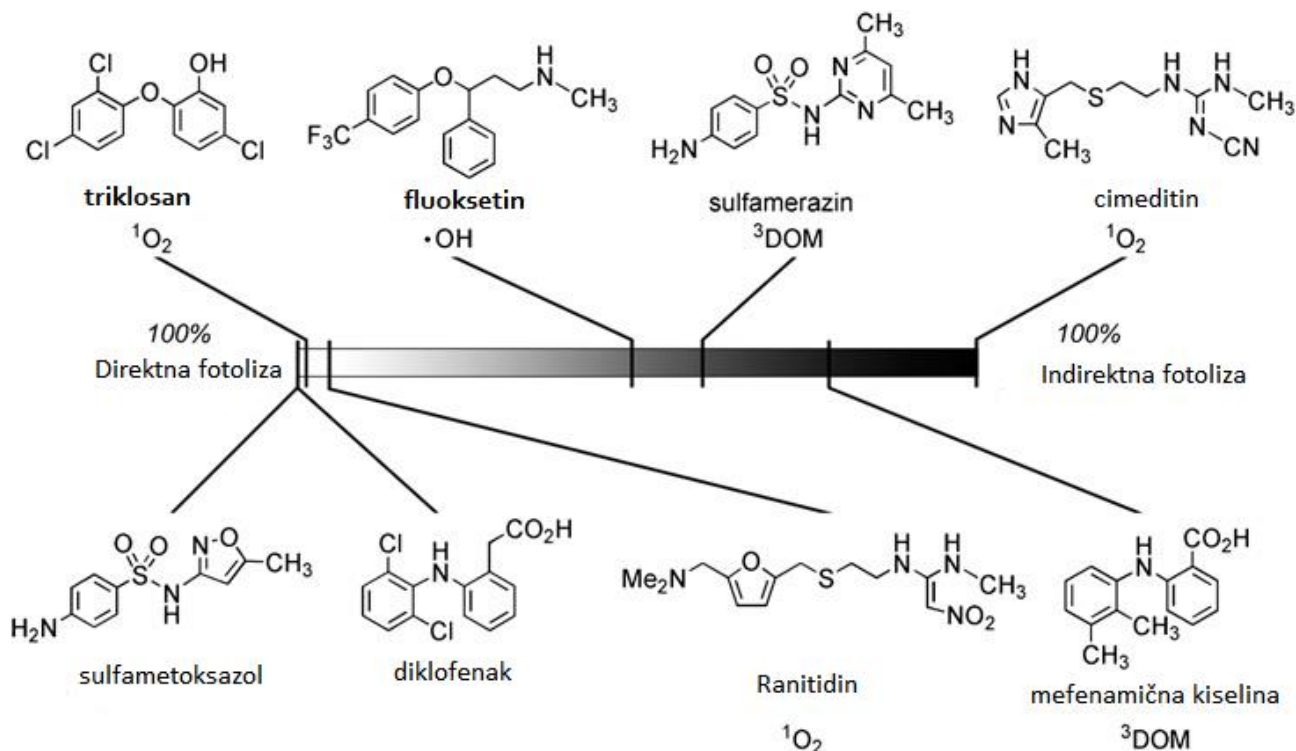
Sve u svemu, ukupna brzina razgradnje prilikom fotolize je zbroj konstante 1. reda i konstante 2. reda za reakcije s reaktivnim česticama, pomnožen s koncentracijom PPRI-a u stabilnom stanju.

$$k_{obs} = 2.303 \int_{\lambda} (\Phi_{\lambda} \epsilon_{\lambda} I_{\lambda}) d\lambda + \sum_j k_{i,j} [PPRI_j] \quad (2)$$

U gornjem izrazu 1. član predstavlja stupanj direktne fotolize, dok drugi član predstavlja sumu indirektno fotolize koja je umnožak konstante brzine 2. reda za reakcijsku vrstu od interesa s koncentracijom dotičnog PPRI-a. Općenito spojevi mogu reagirati direktnom, indirektnom ili kombinacijom ovih fotoliza. Točni omjer direktne i indirektno fotolize je funkcija kvantnog iskorištenja, svojstva spoja da apsorbira zračenje, konstanti

brzine reakcije s PPRI-ima i koncentracije PPRI-a u stabilnom stanju. Brzina apsorpcije svjetlosti i koncentracije PPRI-a u stabilnom stanju funkcija je doba dana (intenziteta svjetlosti) kao i okolišnih uvjeta.

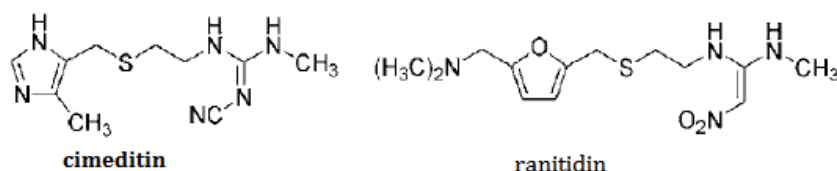
Doprinos direktnoj ili indirektnoj fotolizi za izabrane farmaceutika prikazan je na **slici 4.**



**Slika 4.** Doprinos direktnoj ili indirektnoj fotolizi. Doprinos izravnoj fotolizi smanjuje se s lijeva na desno [1]

#### 4.5.1. Direktna fotoliza

Struktura spoja ima značajan utjecaj na direktnu fotolizu. Tako npr. ranitidin i cimetidin (**slika 5**), dva lijeka vrlo slične strukture različito reagiraju na zračenje. Ranitidin apsorbira zračenje valnih duljina preko 290 nm i gotovo trenutno podlježe izravnoj fotolizi, dok cimetidin ne apsorbira zračenje iznad 290 nm i podlježe jedino indirektnoj fotolizi. Ovo je dokaz da spojevi unutar iste terapijske skupine i vrlo sličnih struktura mogu reagirati vrlo različito.



**Slika 5.** Kemijska struktura cimetidina i ranitidina [1]

Za određivanje brzine direktne fotolize neophodna su dva parametra: apsorptivnost spoja kao funkcija valne duljine ( $\epsilon_\lambda$  koji se lako mjeri UV/vidljivim spektrofotometrom) i kvantno iskorištenje.

Farmaceutici koji apsorbiraju zračenje izloženi su direktnoj fotolizi. Brzina razgradnje posljedica je apsorpcije svjetlosti i kvantnog iskorištenja. Poluraspad prilikom direktne fotolize može trajati od minute do nekoliko desetaka dana. Direktna fotoliza proučena je na tek nešto više od 40 spojeva što je i dalje jako mali broj s obzirom na ukupni broj farmaceutika detektiranih u okolišu. Budući cilj je odrediti kvantno iskorištenje za čim više spojeva (ako ih već nema u literaturi) kako bi se utjecaj direktne fotolize mogao uključiti u modele koji predviđaju sudbinu farmaceutika u okolišu. Struktura spoja, osim na brzinu reakcije, utječe i na mehanizam direktne fotolize. Npr. aromatski ugljikovodici imaju tendenciju cijepanja veze ugljik-halogen. Farmaceutici iz iste skupine mogu se vrlo slično ponašati.

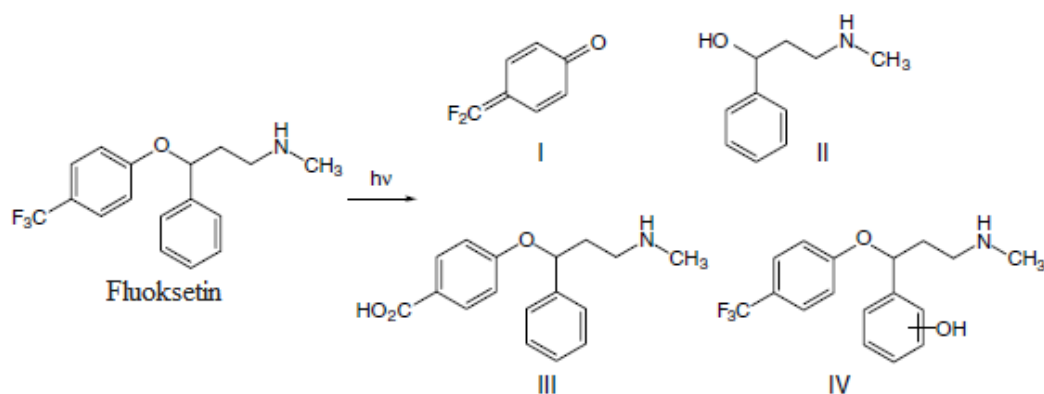
#### 4.5.2. Indirektna fotoliza

Najjednostavniji pokus kako bi se utvrdilo da li je indirektna fotoliza važna za fotokemijsku sudbinu određenog farmaceutika je da se uspoređi brzina razgradnje u uzorku čiste vode i u uzorku prirodne vode koja sadrži otopljene komponente. Ubrzanje razgradnje u prisutnosti otopljenih komponenti, kao što su otopljenje organske tvari ili nitrat ion glavni je dokaz utjecaja PPRI-a. Kroz eksperimente ovakve vrste, utvrđeno je da PPRI-i imaju važnu ulogu u fotokemijskoj sudbini malog broja farmaceutskih spojeva. Povećavanjem broja istraživanja na ovom području očekuje se proširenje broja zahvaćenih farmaceutika s obzirom na veliku raznolikost PPRI-a.

Ispitana je uloga hidroksil radikala na razgradnju karbamazepina, klobifričnu kiselinu, ofloksacin, ibuprofen i fluoksetin. Hidroksil radikal posjeduje visoke vrijednosti konstante, ali

male koncentracije stacionarnog stanja u osunčanim vodenim sustavima. Prema tome reakcije s hidroksil radikalom imaju vijek poluraspada između jednog i tisuću dana.

U dvije odvojene studije određivana je brzina razgradnje karbamazepina i klofibrčne kiseline pod utjecajem direktne fotolize, te je utvrđeno vrijeme poluraspada od 100-400 dana, odnosno 25-100 dana. Prisutnost nitratnog iona u koncentraciji 10 g/L smanjilo je vrijeme poluraspada za dva puta, dok 5 mg/L huminskih kiselina povećava vrijeme poluraspada za 4 puta za karbamazepin. Dodavanjem i nitrata i huminskih kiselina dolazi do smanjenja vremena poluraspada klofibrčne kiseline. Druga studija pokazala je da se u prirodnim vodama brzina fotokemijske razgradnje klofibrčne kiseline povećava 2 puta, ali ukoliko dodamo izopropilni alkohol ne dolazi do ubrzanja fotolize, što ukazuje na važnost radikalskih vrsta. Još jedan od značajnijih primjera je dodatak hidroksi radikala pri fotolitičkoj razgradnji fluoksetina. Fluoksetin daje 4 razgradna produkta (**slika 6**), od kojih su 3 identificirana pri sporoj direktnoj fotolizi, a u prisutstvu hidroksil radikala nastaje i 4. spoj te su dva spoja koja nastaju direktnom fotolizom nastala brže [1].



**Slika 6.** Produkti razgradnje direktne fotolize fluoksetina (I, II, III). Hidroksil radikalom posredovani procesi (I, II, IV) [1]

## **5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU**

### **5.1.UZORKOVANJE I ANALIZA REZULTATA**

#### **5.1.1. Priprema uzorka**

Analiza organskih zagađivala u okolišu predstavlja kompliciran zadatak zbog složenosti samog uzorka i malih koncentracija analita, stoga je u većini slučajeva potrebno izolirati analit komponentu iz uzorka [1]. Uzorkovanje i priprema uzorka započinju na mjestu uzorkovanja. Pravilno uzorkovanje, transport reprezentativnog uzorka od mjesta uzorkovanja do laboratorija, pravilno poduzorkivanje uzorka u laboratoriju i metoda pripreme uzorka za analizu imaju veliki utjecaj na točnost i pouzdanost rezultata analize [11]. Tipična analitička metoda uključuje filtraciju, ekstrakciju, pročišćavanje i koncentriranje [1].

#### **5.1.2. Čuvanje uzorka**

Prije daljnjih analiza uzorak se filtrira, osim u slučaju aminoglikozida za koje se ne provodi filtracija zbog gubitaka uzrokovanih sorpcijom. Potom se uzorku podešava određeni pH, u rasponu od kiselog do baznog područja, ovisno o prirodi antimikrobnog sredstva. Neposredno prije ekstrakcije potrebno je podesiti pH na područje oko 7, uglavnom oko 7,5. Kako bi se izbjegla fotolitička razgradnja uzorci se pohranjuju na tamna mjesta s niskim temperaturama. Uzorci bi se trebali čim prije analizirati jer predugo skladištenje može utjecati na koncentraciju analita u uzorku.

#### **5.1.3. Koncentriranje i pročišćavanje**

Kemijska analiza kompleksnih uzoraka često zahtijeva odvajanje analita od matice uzorka, odnosno ekstrakciju. To je operacija potpunog ili djelomičnog odvajanja smjese tvari na temelju različitih topljivosti u pojedinim otapalima. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Moguće je povećati selektivnost raspodjelom uzorka između dvije nemješljive tekućine u kojima analit i njegova matica imaju različitu topljivost. U idealnom slučaju postupak ekstrakcije trebao bi biti jednostavan, brz, jeftin, trebao bi dati kvantitativne analitičke rezultate bez gubitaka ili razgradnje analita i trebao bi dati otopinu



analita koja je dovoljno koncentrirana da se može izravno mjeriti bez potrebe za koncentriranjem.

Neke starije metode koncentriranja i pročišćavanja kao što su Soxhlet ekstrakcija i liofilizacija su gotovo u potpunosti zamjenjene tehnikom ekstrakcije čvrstom fazom (eng. *solid phase extraction*, SPE), koja se pokazala korisna za sve tipove uzoraka. Ekstrakcija čvrstom fazom provodi se na kartušama ispunjenim sorbensom. Trenutni trend u razvoju postupaka ekstrakcije je smanjiti potrošnju organskih otapala zajedno s razvojem sve bržih tehnika, automatizacije, integracije (*on-line* povezivanje), poboljšanje ponovljivosti. Poboljšanje selektivnosti nije jedan od glavnih ciljeva s obzirom da se zadovoljavajuća selektivnost postiže kromatografskim metodama analize.

Postoje različiti pristupi obzirom na postavljeni cilj:

- 1.) određivanje velike skupine farmaceutskih spojeva
- 2.) određivanje određenih spojeva koji pripadaju određenim grupama antibiotika [1].

#### **5.1.3.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće**

Konvencionalna ekstrakcija tekuće-tekuće važna je i vrlo česta separacijska tehnika za velik raspon analita. Provodi se u lijevcima za odjeljivanje i najčešće je vezana uz različite nedostatke kao što je nastajanje emulzije, slabo odjeljivanje faza, nizak stupanj automatizacije te znatan uloženi rad analitičara. Danas je ta metoda osuvremenjena uvođenjem u rad posebno pripremljenih kolona punjenih anorganskim materijalima (npr. dijatomejska zemlja) širokih pora na koji se nanose vodeni ekstrakti i raspoređuje u obliku tankog filma.

#### **5.1.3.2. Ekstrakcija čvrstom fazom**

Ekstrakcija čvrstom fazom je postupak ekstrakcije spojeva koji su otopljeni u tekućoj matici. Načelo toga ekstrakcijskog postupka, koji posljednjih deset godina zbog brzine, učinkovitosti, selektivnosti i mnogo manjeg potroška štetnih otapala iz analitičke uporabe istiskuje ekstrakciju tekuće-tekuće, posebno kad je riječ o koncentriranju tragova analita i uklanjanju interferencija, sastoji se u propuštanju velikog volumena uzorka kroz sorbens

smješten u mikrokolonama ili u obliku diskovima. Ekstrakcija čvrstom fazom nalazi primjenu kod koncentriranja analita i, uklanjanja interferirajućih spojeva, te promjene otapala [13].

## **5.2. KVANTITATIVNE ANALITIČKE METODE**

Glavna prepreka pri razvoju analitičke metode su niske koncentracije farmaceutika u okolišu, stoga metode moraju biti vrlo osjetljive i selektivne. Kromatografija je danas najčešće korištena separacijska tehnika koja mogućnošću svoje modifikacije pruža velike mogućnosti u istraživanju i praksi. Kromatografija se temelji na različitoj sorpciji sastojaka smjese na nekom prikladnom sorbensu. Kromatografski sustav sastoji se od analiziranog uzorka te pokretne i nepokretne faze. Tijekom kromatografskog procesa on se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Zbog njihova gibanja narušava se ravnotežno stanje, što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze. Nepokretna faza mora biti tako odabrana da je zadržavanje molekula na njoj selektivno, pa različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese [14].

Najčešće primjenjivane metode:

1. Plinska kromatografija
2. Tekućinska kromatografija

### **5.2.1. Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija u analizi farmaceutika je prilično skupa i ograničena zbog fizikalno-kemijskih karakteristika spojeva, koji mogu biti prilično polarni, nehlapljivi i u nekim slučajevima nestabilni pri povišenim temperaturama. Prethodno pročišćavanje je uvijek potrebno što analizu čini teškom i u globalu nepreciznom.

## **5.2.2. Tekućinska kromatografija**

Tekućinska kromatografija postaje sve učestalija metoda u identifikaciji i kvantifikaciji antibiotika zbog svoje visoke osjetljivosti. Uglavnom se koristi za polarne spojeve i spojeve nestabilne na povišenoj temperaturi [1].

### **5.2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) jedna je od najčešće primjenjivanih i najučinkovitijih metoda kojom se može odijeliti veliki broj farmaceutika. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana s UV detektorom ili s detektorom s nizom dioda pokazala se kao važna analitička metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi farmaceutika. Prednosti HPLC metode su višekratna upotreba kolona, automatsko unošenje uzorka, skraćeno trajanje analize te detekcija i kvantifikacija koje se mogu postići upotrebom kontinuiranih protočnih detektora. Zbog primjene visoko osjetljivih detektora dovoljne su nanogramske količine uzorka, a omogućeno je dobro razlučivanje sastojaka smjese. Ove prednosti omogućuju točnost i preciznost rezultata analize [15].

## 6. ZAKLJUČAK

Za sada postoji nedovoljno dostupnih informacija o farmaceuticima u okolišu koje bi pomogle pri donošenju konačnog zaključka o značaju i utjecaju otpornih bakterija u okolišu te omogućila procjenu rizika na ljudsko zdravlje i rad ekosustava. Za sada se smatra da uvođenje antibiotika u okoliš, čak i iz bolnica nije velika prijetnja, barem u smislu otpornosti bakterija. Potpuna analiza rizika za okoliš ne može se izvesti na temelju dostupnih podataka jer i dalje nedostaje niz fundamentalnih podataka o sudbini i učinku antibiotika u okolišu.

Otkrivanje izvora farmaceutika kao zagađivala predstavlja najveći potencijal za njihovo uklanjanje. Smanjenje zagađenja okoliša farmaceuticima uključuje širok spektar mjera i radnji, prije svega odgovarajuću obradu otpadnih voda zatim smanjenje prepisanih doza u medicini, zabrana korištenja u veterini za poboljšanje rasta te odgovarajuće odlaganje neiskorištenih farmaceutika i onih kojima je poršao rok trajanja.

Postoje tri sfere u životnom ciklusu farmaceutika na koje bi se moglo utjecati u cilju pronalaska rješenja:

- 1.) razvoj lijekova (prilagodba),
- 2.) rukovanje lijekovima (promjene u praksi),
- 3.) tehnička kontrola emisija u urbana vodena područja (obrađena otpadne vode, uklanjanje ostataka antibiotika, vrijeme izloženosti...)

Kao što je već spomenuto, prvi i najveći izazov je identificirati farmaceutike koji imaju potencijalan rizik za okoliš. Cilj svakog programa za rješavanje problema novih zagađivala u okolišu je kreirati mehanizam za ranu identifikaciju njihove prisutnosti u okolišu, prije nego se prošire dalje u okoliš.

## 7. SKRAĆENICE I SIMBOLI

### Skraćenice

API	<i>active pharmaceutical ingredient</i>
PPCP	<i>pharmaceuticals and personal care products</i>
OTC	<i>over-the-counter</i>
PPRI	<i>Photochemically produced reactive intermediate</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

### Simboli

$K_{ow}$	koeficijent razdiobe oktanol voda
$K_d$	koeficijent sorpcije
$\kappa_{obs}$	konstanta brzine izravne fotolize
$\varphi_\lambda$	kvantno iskorišćenje
$\varepsilon_\lambda$	molarna apsorptivnosti
$I_\lambda$	solarno zračenje
$\lambda$	valna duljina

## 8. LITERATURA:

- [1] Analysis fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, Comprehensive analytical chemistry, M. Petović, D. Barcelo (ur.), Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [2] R. Naidu, V. A. A. Espana, Y. Liu, J. Jit, Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management, Chemosphere 154 (2016) 350–357.
- [3] I. T. Carvalho, L. Santos, Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario, Environment International 94 (2016) 736–757.
- [4] C. G. Daughton, “Emerging” Chemicals as Pollutants in the Environment: a 21<sup>st</sup> Century Perspective, Renewable Resources Journal 23 (4) (2005) 6-23.
- [5] R. P. Tasho, J. Y. Cho, Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review, Science of The Total Environment 563-564 (2016) 366–376.
- [6] K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, Journal of Environmental Management 90 (8) (2009) 2354–2366.
- [7] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II, Chemosphere, 75 (4) (2009) 435–441.
- [8] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, Chemosphere, 75 (4) (2009) 417–434.
- [9] K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, Journal of Environmental Management, 90 (8) (2009) 2354–2366.
- [10] K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the environment, University Medical Center Freiburg, Freiburg, 2008.

[11] F. Settle, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Journal of the American Chemical Society, 120 (1998) 6633–6633.

[12] D. E. Raynie, Extraction, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, Academic Press, 2003., str.118-128.

[13] J. R. Dean, Extraction Techniques in Analytical Sciences, Chichester, WILEY, 2009., str. 49-53.

[14] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-237.

[15] A. Braithwaite, F. J. Smith, Chromatographic Methods, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2002., str. 258-261.

## **9. ŽIVOTOPIS**

Ema Blagus rođena je 24. ožujka 1995. godine u Zagrebu. Osnovnu školu OŠ Jordanovac, završava 2009. te Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga 2013. Iste godine upisuje preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Od 2015. sudjeluje u udruzi BEST (Board of European Students of Technology) u organizaciji natjecanja AIBG (Artificial Intelligence Battle Ground) i EBEC Zagreb – Dani inženjera.